

Palabras del Presidente del Jurado, Dr. EDUARDO JUAN GIMENO

Sr. Presidente de la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Dr. Carlos Octavio Scoppa

Sr. Director de la Estación Experimental Bariloche del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA)

Sres. Académicos, Colegas

Señoras y señores:

Nos reunimos hoy en Sesión Pública Extraordinaria para entregar, una vez más, el Premio «Prof. Dr. Osvaldo A. Eckell». Debo agradecer muy especialmente a los integrantes del jurado que tuve el privilegio de presidir, los Académicos de Número Dr. Bernardo Jorge Carrillo, Dra. Nélide Virginia Gómez, Dr. Enrique Leo Portiansky y el Académico Correspondiente Dr. Ramón Pedro Nosedá.

La Academia, entre sus múltiples actividades, distribuye una docena de premios, según reglamentos establecidos y en diversos sectores de su campo científico específico. Dentro de ellos el Premio «Prof. Dr. Osvaldo A. Eckell» tiene una larga tradición: fue instituido en 1975 por la Sra. Celina Vega de Eckell en memoria de su esposo y es administrado, desde entonces, por la Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria.

El Dr. Osvaldo A. Eckell fue un médico veterinario que tuvo una descolante trayectoria desde sus tiempos de estudiante y a lo largo de toda su multifacética carrera: llegó a Coronel en el Comando de Remonta del Ejército, fue Profesor en La Plata y en Buenos Aires, dirigió la *Revista de Medicina Veterinaria* y realizó aportes científicos muy importantes referidos a clínica y patología en equinos y en bovinos. Fue Miembro de Número de esta academia durante veinticuatro años llegando a Secretario General, cargo que ocupaba al momento de su fallecimiento en 1974. En la página de la Academia [se puede leer on line](#) una biografía muy amena e interesante del Dr. Eckell.

El Premio Eckell tiene como objetivo reconocer aportes relevantes en el área de Patología y Clínica Veterinarias y se puede otorgar en dos modalidades: 1) a trabajos científicos originales realizados en el país, y 2) a personas que se hayan destacado en las especialidades mencionadas. Para cada convocatoria, siempre en años impares, el jurado determina la modalidad en que se convocará el premio y, además, determina la especie animal. Esta distinción fue otorgada en doce oportunidades, comenzando en 1976; la información completa sobre los [premios ya otorgados](#), también está en la página web de la Academia.

En esta ocasión la Academia sale de Buenos Aires para entregar el Premio Eckell, reafirmando una tendencia de años recientes que es llevar sus actividades a diferentes áreas geográficas, facilitando la interacción no solo con los premiados sino también con autoridades, colaboradores, familiares, estudiantes y con la comunidad en general. Hoy tenemos el beneplácito y el honor de ser recibidos en la Estación Experimental Agropecuaria Bariloche del INTA, un centro de investigación y extensión que ejerce sus actividades en la provincia de Neuquén y parte de la provincia de Río Negro. La EEA trabaja en varias áreas involucradas en actividades rurales: Producción Animal, Recursos Naturales, Recursos Forestales y Desarrollo Rural y constituye un pilar inestimable para el desarrollo de la comunidad en la región.

En el llamado del 2015, el jurado decidió convocar a trabajos sobre patología y/o clínica en todas las especies de animales domésticos. El llamado se limitó a Médicos Veterinarios o Doctores en Ciencias Veterinarias con residencia en nuestro país y graduados de instituciones de la Argentina. Las obras debían ser originales, publicadas o inéditas y realizadas en el país entre 2013 y 2015. La cantidad y calidad de los trabajos presentados requirió un arduo trabajo de los cinco miembros del jurado que, finalmente, eligieron de manera unánime el trabajo presentado por Agustín Martínez, Dale Gardner y Carlos Robles. Como es requisito y tradición en la Academia, el dictamen fue luego convalidado por el plenario académico, también de manera unánime. La contribución

seleccionada lleva por título: **«Intoxicación experimental por *Astragalus pehuenches*: caracterización histopatológica en ovinos»**.

Este trabajo se destaca por su originalidad, calidad científica y gran interés epidemiológico. El estudio analiza la intoxicación experimental por *Astragalus pehuenches* en ovinos y describe los hallazgos histopatológicos. El trabajo constituye una contribución importante para entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de esta enfermedad dañina para la producción ovina.

Al momento de analizar los antecedentes de los autores descubrimos que el primer autor, Agustín Martínez, posee los títulos de Médico Veterinario otorgado por la Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires en 2010 y de **Doctor en Ciencias Veterinarias** otorgado por la Universidad Nacional de La Plata en 2015. Durante sus estudios recibió becas de la Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires y del INTA. A pesar de su corta carrera ya acredita varios trabajos publicados y presentaciones en reuniones científicas en el país y en el exterior. Participa activamente en reuniones científicas y registra actividades docentes de posgrado.

El segundo autor del trabajo es el Dr. Dale Gardner, un reconocido científico del Poisonous Plant Research Laboratory en Logan, Utah, en los Estados Unidos. El Dr. Gardner recibió los grados de BSc en Química en el Cedarville College y de PhD en Química Analítica en la Colorado State University. A lo largo de su carrera ha publicado alrededor de 300 trabajos referidos a la identificación de compuestos vegetales tóxicos en muestras de tejidos animales y vegetales.

Por su parte, el colega Carlos Alejandro Robles es Médico Veterinario graduado en la Universidad Nacional de La Plata y realizó su especialización en Patología Veterinaria en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Mar del Plata. Posee, además, el título de Master of Sciences in Tropical Veterinary Medicine de la Universidad de Edimburgo (Escocia). Acredita numerosos períodos de trabajo en el exterior: Dinamarca, Suecia, España, Chile, Canadá y Francia. Siempre con énfasis en Patología y Sanidad en Ovinos y

Caprinos. Actualmente es responsable del Grupo de Salud Animal del INTA Bariloche. Es Coordinador del Proyecto Nacional sobre Enfermedades de ovinos, caprinos y camélidos sudamericanos y responsable del Servicio de Diagnóstico de Sanidad Animal (SIRSA) para Patagonia Norte y Sur. Numerosos organismos nacionales e internacionales se han beneficiado de sus valiosas contribuciones como especialista en Sanidad Animal: entre otras SENASA, FAO, CONICET, FONCYT, FONTAR, CICPBA y universidades nacionales. Es autor de docenas de trabajos científicos publicados y presentaciones en reuniones científicas. También ha dirigido pasantes, becarios y tesis. Tiene una larga carrera como docente, tanto de grado como de posgrado. El Dr. Robles es un investigador consolidado que está realizando, a lo largo de muchos años, una encomiable tarea para su especialidad, para las ciencias veterinarias y para la sociedad a la que nos debemos.

Por todo lo antedicho, me complazco en felicitar a los autores del trabajo en nombre del jurado y de la Academia y, además, corresponde manifestar la alegría de todos nosotros al reconocer la tarea de colegas talentosos, y poder hacerlo en el marco de la rica tradición de este premio.

Si el profesor Eckell nos estuviera mirando seguramente se sentiría muy complacido al saber que su nombre, muchos años después de su partida, sigue estimulando a la profesión veterinaria y a la especialidad que tanto amó.

Hacemos extensivas nuestras felicitaciones también al resto del personal del INTA Bariloche y a los familiares de los premiados.

Seguidamente invitamos al colega Agustín Martínez a hacer uso de la tribuna.

Muchas gracias por vuestra atención.

Intoxicación experimental por *Astragalus pehuenches*: caracterización histopatológica en ovinos

A. MARTÍNEZ¹, D. R. GARDNER²,
Y C. A. ROBLES¹

¹ Grupo Salud Animal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). CC 277 (8400) Bariloche, Argentina. E-mail: martinez.agustin@inta.gob.ar

² Poisonous Plants Research Laboratory, US Department of Agriculture Agricultural Research Service, Logan, UT, USA

Introducción

En el mundo, existen más de 2.500 especies de *Astragalus* distribuidas en todos los continentes excepto Oceanía y Antártida (Gómez-Sosa, 1979; CPVCS, 2014). Toxicológicamente, el género *Astragalus* se puede dividir en tres grupos: las especies que acumulan selenio, las que poseen nitrocompuestos y las que poseen un alcaloide indolizidínico llamado swainsonina (Cook y col., 2009). Este último grupo, vulgarmente llamado *locoweeds*, ha sido estudiado ampliamente en Estados Unidos (James y col., 1970, Cook y col., 2011) y China (Chenchen y col., 2014), por ser una de las intoxicaciones que mayores pérdidas económicas produce en la cría extensiva de ganado en esos países (Stegelmeier y col., 2009).

En Argentina, hay registradas 70 especies del género *Astragalus* (CPVCS, 2014) y hasta el momento son tres las especies en que se han determinado concentraciones tóxicas de swainsonina: *Astragalus garbancillo* en el Noroeste Argentino (Micheloud y col., 2014), *Astragalus illini* (Martínez, datos inéditos) y *Astragalus pehuenches* en la Patagonia Argentina (Molyneux & Gomez-Sosa, 1991, Martínez y col., 2014). Si bien, desde principios del siglo pasado los pobladores rurales reconocen a estas especies como tóxicas (Ragonese, 1975; Califano y col., 2013), son escasos los

diagnósticos confirmados de intoxicaciones espontáneas. En el año 2000 fue reportado el primer brote de intoxicación a campo por *Astragalus pehuenches* en ovinos de la provincia de Río Negro donde fue afectada el 73 % de una majada compuesta por 300 madres (Robles y col., 2000). Recientemente, se diagnosticó la intoxicación por *Astragalus garbancillo* en dos ovinos de la Prepuna Salteña (Micheloud y col., 2014).

Para confirmar el poder toxigénico de una especie vegetal, es condición *sine qua non* la reproducción experimental mediante la administración de la planta a animales de la especie que es afectada en forma natural (Tokarnia y col., 2012). En ese sentido, y debido a que no existen registros de ensayos de la intoxicación experimental por *Astragalus* hallados en Argentina, se plantea realizar el presente trabajo que tuvo como objeto reproducir experimentalmente la intoxicación por *Astragalus pehuenches* en ovinos y describir los hallazgos histopatológicos.

Materiales y Métodos

Planta

En el año 2013 se cosecharon ejemplares de *Astragalus pehuenches* (Figura 1) en zonas rurales aledañas a las localidades de Los Menucos, Maquinchao e Ingeniero Jacobacci ubicadas en la Región Sur de la provincia de Río Negro (Figura 2).



Figura 1. Especímenes de Astragalus pehuenches utilizados para la intoxicación experimental en ovinos

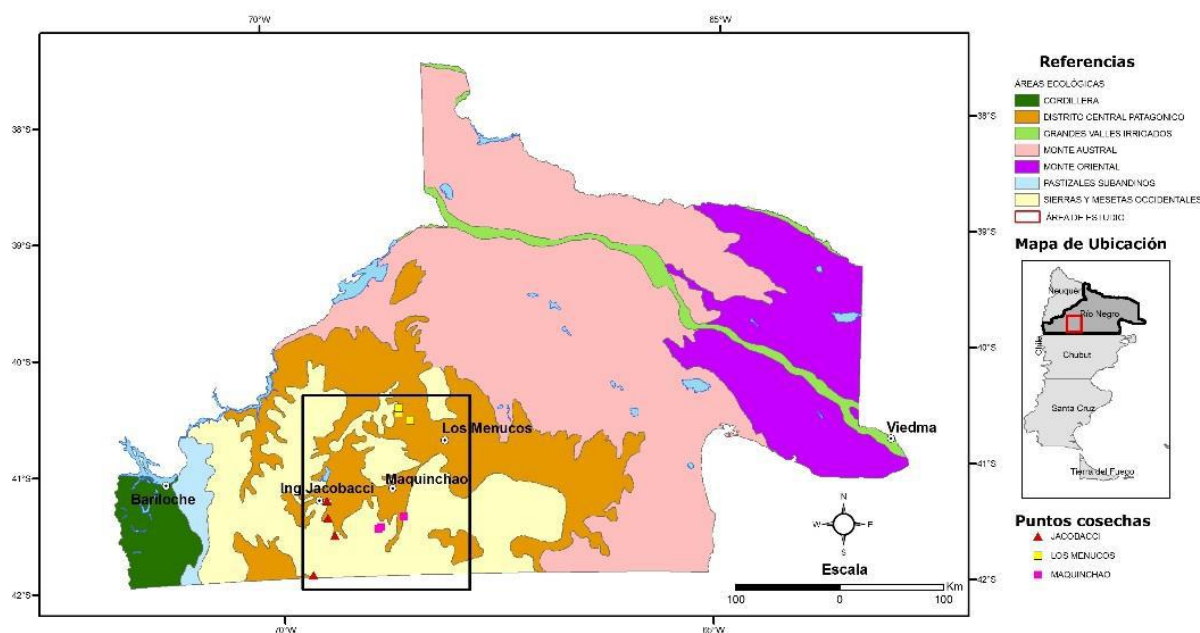


Figura 2. Mapa de la provincia de Río Negro y sus áreas ecológicas, indicando con el recuadro negro el área donde se cosecharon los especímenes de *Astragalus pehuenches*

El material recolectado se dejó orear a la sombra por 24-48 horas hasta su procesamiento, el cual consistió en separar los tallos (T) de las hojas, flores, frutos y semillas (HFF). Luego cada *pool* fue secado por separado en estufa con ventilación forzada a 55° C por 48 horas y el material fue triturado con un molino vertical con tamiz de 1 mm. El polvo obtenido se almacenó a temperatura ambiente en envases herméticos, al resguardo de la luz solar y humedad, hasta su análisis toxicológico y uso en la confección del alimento.

Muestras secas y molidas fueron enviadas al Poisonous Plants of Research Laboratory (PPRL) de Logan, Estados Unidos, para la detección y cuantificación de SW mediante cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de masa (HPLC-MS).

Un ejemplar entero se prensó en papel periódico y se envió al Herbario de la Facultad de Ciencias Agronómicas y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, para el almacenamiento y la identificación botánica por parte del taxónomo Profesor Dr. Néstor Bayón.

Diseño experimental

Se utilizaron ocho ovinos hembra, raza merino, de 15 meses de edad con un peso promedio de 31,5 kg. Los animales se alojaron individualmente en corrales de piso de material de 8,75 m². Los animales fueron provistos por un establecimiento cercano a la localidad de Pilcaniyeu, los cuales nunca tuvieron acceso al consumo de *Astragalus pehuenches*.

Protocolo de intoxicación

Luego de un periodo de acostumbramiento de dos semanas, se procedió al inicio del protocolo de intoxicación con una duración de 54 días. Diariamente se administró, según grupo asignado «Locopellets»¹ al grupo tratado (GT, n=5) o alimento balanceado comercial al grupo control (GC, n=3). La cantidad de Locopellets administrado se calculó según peso del animal, contemplando alcanzar una dosis diaria de 2mgSW/kg/PV. Para satisfacer el requerimiento energético diario se administró pellets de alfalfa hasta equiparar el metabolismo de mantenimiento.

Estudios patológicos

En el día 54 los animales fueron eutanasiados y se realizó la necropsia evaluando alteraciones macroscópicas. Se tomaron muestras de SNC, hígado, riñón y útero. Todas las muestras obtenidas se colocaron en formol bufferado al 10 % por 48 horas, excepto el SNC que fue fijado por 7 días.

Para la evaluación histopatológica del SNC se realizaron cortes obteniendo secciones coronales determinadas según regiones y núcleos encefálicos seleccionados para su estudio (Peters, 2002).

¹ Locopellets: Alimento compuesto por 67 % de polvo de alimento balanceado comercial (Balansur®) y 33 % de polvo de *Astragalus pehuenches*, reconstituido en forma de pellet.

Tinción de hematoxilina y eosina (HE)

Las muestras fijadas fueron procesadas con las técnicas histológicas de rutina, siendo incluidas en bloques de parafina, cortadas con un espesor de 5 μm y coloreadas con la técnica de Hematoxilina y Eosina (HE) para la observación mediante microscopia óptica convencional. El grado de lesión se clasificó según la intensidad de vacuolización en nulo (0), pobre (1), moderado (2) y fuerte (3).

Técnica de microscopia electrónica de transmisión (MET)

Muestras de sistema nervioso central y tejido uterino se utilizaron para la observación mediante microscopio electrónico de transmisión. Las muestras cuboides, de 1 mm de lado, fueron fijadas en solución de glutaraldehído al 2 %, lavadas y posfijadas, deshidratados e incluidos en resina (Epon®). Posteriormente se realizaron cortes ultrafinos (60-90 nm), que fueron contrastados con acetato de uranilo y montados para la observación con microscopio electrónico JOEL 1210.

Técnica de lectinhistoquímica (LHQ)

La técnica de lectinhistoquímica permite establecer el patrón de distribución de los carbohidratos almacenados en las células de las regiones del SNC analizadas. Se realizó con cortes de 5 μm de tejidos previamente fijados e incluidos en parafina. El listado de las lectinas que fueron utilizadas está enumerado en la Tabla 1. Los cortes se clasificaron según la intensidad de coloración en nulo (-), pobre (+), moderado (++) y fuerte (+++). Como sistema de detección se utilizó el método basado en Estreptavidina-Biotina (DakoCytomation). Como cromógeno se utilizó 3,3' diaminobenzidina tetrahidroclorada (DAB) (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Se utilizó hematoxilina de Harris como coloración de contraste.

Tabla 1. Lectinas empleadas sobre muestras de SNC con su nombre completo y acrónimos, especificando los carbohidratos a las cuales son afines

LECTINA	ACRONIMIA	AFINIDAD
<i>Triticum vulgaris</i>	WGA	β -D-GlcNAc; NeuNAc
<i>Succinil-WGA</i>	sWGA	(α -(1-4)-D- GlcNAc) ₂
<i>Canavalia ensiformis</i>	Con A	β -D-Man; α -D-Glc
<i>Lens culinary</i>	LCA	α -Glc, α -D-Man

Resultados

Hallazgos patológicos

A la necropsia, se observó abundante depósito graso subcutáneo, perirrenal y epicárdico, corroborando una óptima condición corporal sin observarse diferencias entre ovinos del grupo tratado y del grupo control. En ambos grupos no se observaron alteraciones en tamaño, color y consistencia de los órganos viscerales.

Hallazgos microscópicos

Sistema Nervioso Central

En los ovinos del grupo tratado se apreció un grado variable de vacuolización, cromatólisis y desplazamiento del núcleo de las neuronas hacia la periferia clasificado como *degeneración celular* con compromiso de neuronas. Se observaron diferentes grados de severidad en la vacuolización: i) en las células de Purkinje la cromatólisis fue total, con vacuolas coalescentes que formaban un aspecto de «burbujas» generando una disrupción total del citoplasma, produciendo cambios evidentes en la arquitectura celular, y ii) en neuronas del núcleo reticular medular, la cromatólisis fue más severa observándose dilatación del cuerpo neuronal (Figura 3).

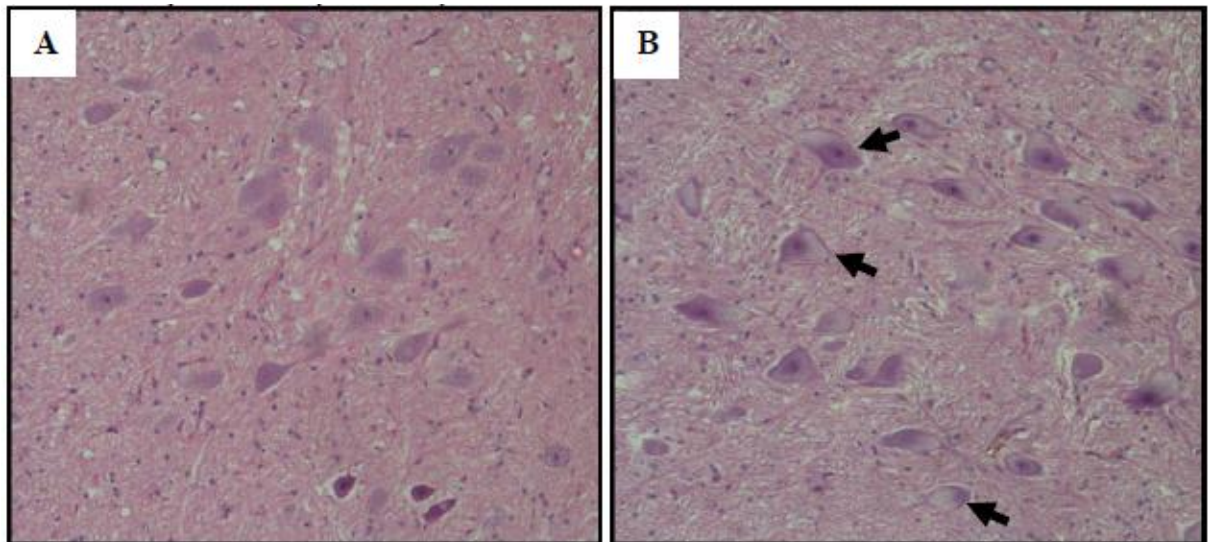


Figura 3. Núcleo reticular medular de un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B). Nótese la severa vacuolización que ocupa gran parte del citoplasma y desplazó el núcleo hacia la periferia (flechas)

En cerebelo se observaron el árbol dendrítico y axones de las células de Purkinje aumentados de 2 a 3 veces en espesor, generando un cambio en la arquitectura de la capa molecular (Figura 4). Además se observó vacuolización de las células de Golgi y células granulares. En periferia a las neuronas de los núcleos profundos y en vecindad del soma de las células de Purkinje se observaron estructuras circulares eosinofílicas de diversos tamaños, clasificados como esferoides axonales y torpedos.

En el núcleo *gracilis* se observaron estructuras circulares eosinofílicas de diversos tamaños, clasificados como esferoides axonales (Figura 5).

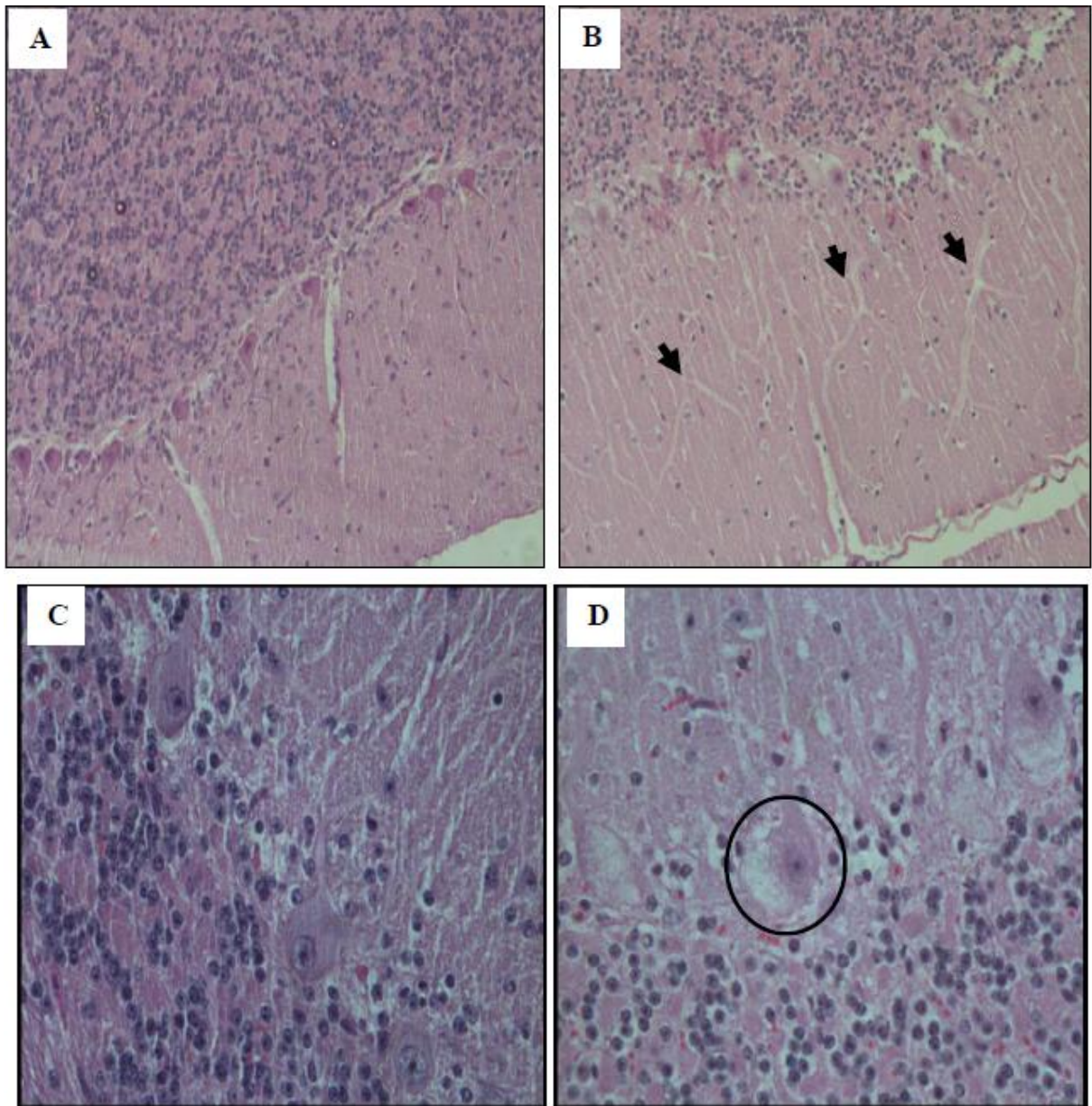


Figura 4. Corteza cerebelar en un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B) nótese el cambio en la morfología de la capa molecular debido al aumento del espesor del árbol dendrítico (flechas). Células de Purkinje de un ovino del GC (C) y de un ovino del GT (D) la severa vacuolización ocupa todo el citoplasma desplazando el núcleo hacia la periferia (círculo)

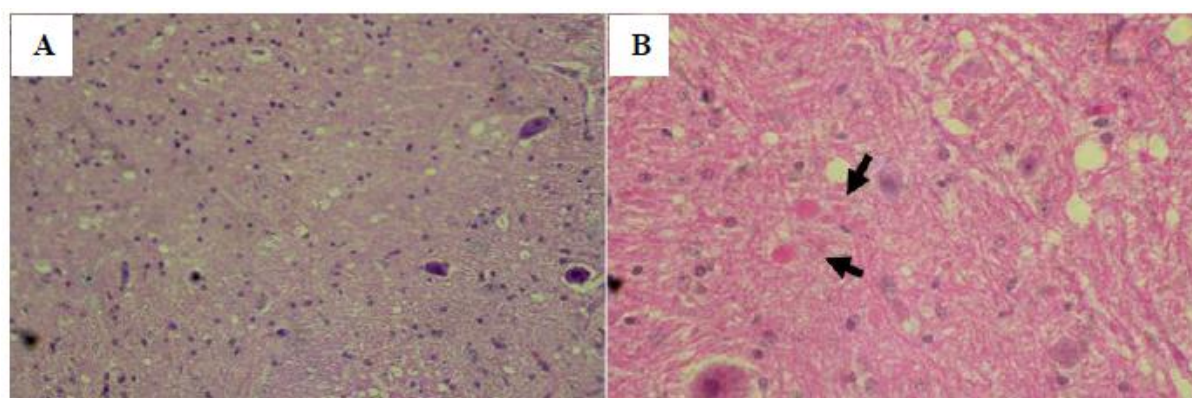


Figura 5. Núcleo gracilis de un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B). Nótese la presencia de esferoides axonales (flechas)

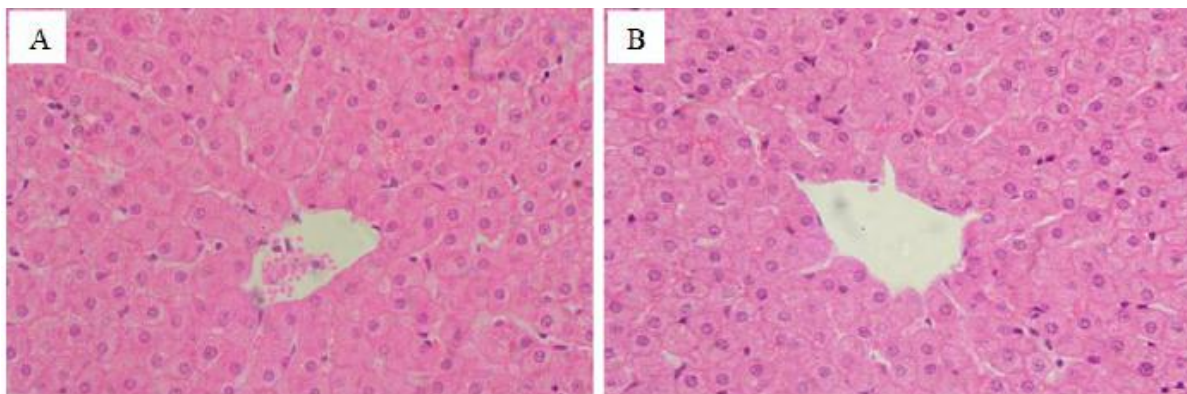
En los ovinos del grupo tratado, el grado de vacuolización varió de leve a moderada y severa según animal, región encefálica, núcleo encefálico y tipo de neurona. Las neuronas con vacuolización más severa fueron las células de Purkinje y las neuronas de la corteza motriz. En los ovinos del grupo control no se observaron lesiones en las regiones evaluadas (Tabla 2).

Tabla 2. Promedio del grado de vacuolización citoplasmática observada en diferentes áreas del SNC para los grupos de ovinos control e intoxicado por Astragalus pehuenches. Escala subjetiva: de 0 a 3 (Sin lesión a Lesión severa)

NÚCLEO NERVIOSO EVALUADO	GRUPO	
	GC (n=3)	GT (n=5)
Células de Purkinje	0	2.6
Núcleo profundo del Cerebelo	0	2.2
Corteza motriz	0	2.4
Núcleo <i>gracilis</i>	0	2.0
Núcleo cuneiforme	0	1.75
Núcleo hipogloso	0	2.0
N. dorsal del Vago	0	1.25
Núcleo reticular lateral	0	1.75
Núcleo reticular medular	0	2.0
Asta ventral de médula espinal	0	1.6

Hígado

En este órgano no se observaron alteraciones evidentes en los animales de ninguno de los grupos del ensayo (Figura 6).



*Figura 6. Parénquima hepático de un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B).
Nótese la ausencia de alteraciones evidentes en los hepatocitos*

Riñón

En los ovinos del grupo tratado, a nivel renal se observó vacuolización en las células epiteliales de los túbulos contorneados proximales de la corteza renal y los túbulos colectores principalmente de la región medular. El grado de la lesión fue severo generando modificaciones en la arquitectura celular. Los ovinos del grupo control no presentaron alteraciones renales detectables en la histología (Figura 7).

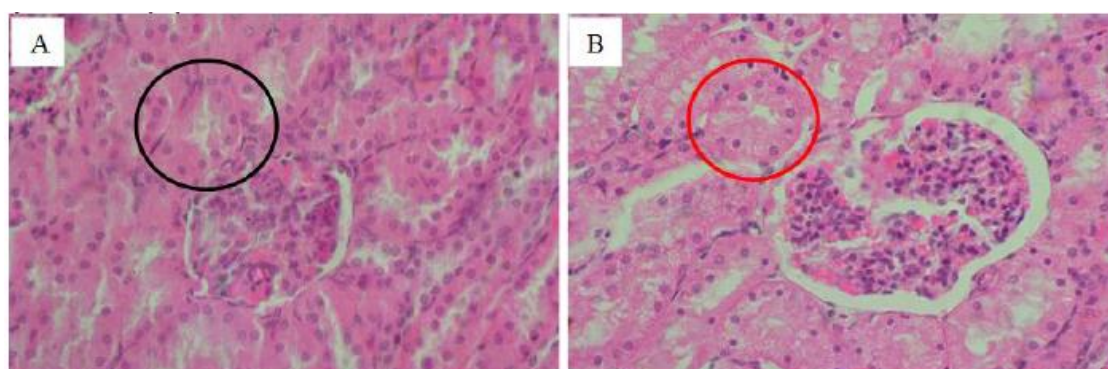


Figura 7. Tejido renal de un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B). Se observa moderada vacuolización en células epiteliales de los túbulos contorneados proximales (círculo rojo)

Útero

En los ovinos del grupo tratado, se observó una vacuolización fina y generalizada en el epitelio endometrial y glandular, mientras que los ovinos del grupo control no presentaron alteraciones uterinas detectables en la histología (Figura 8).

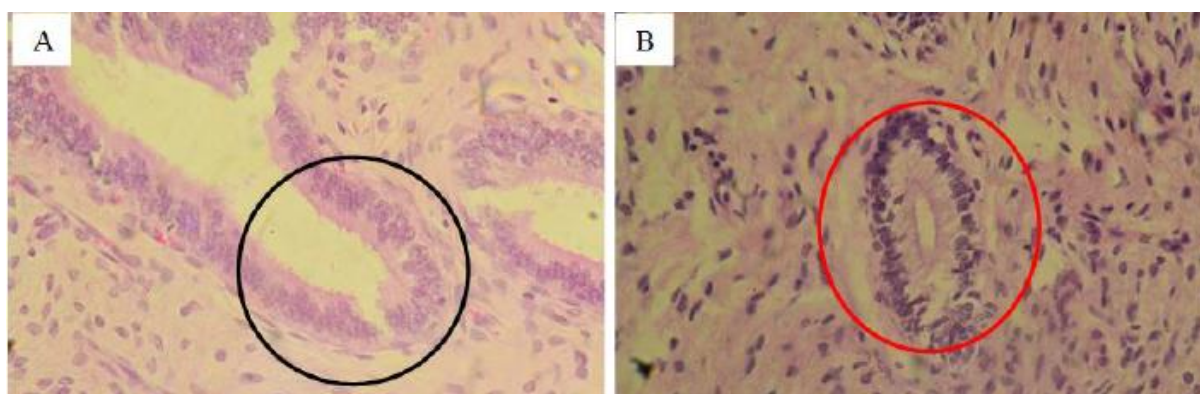


Figura 8. Glándulas uterinas de un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B). Nótese la vacuolización en células glandulares (círculo rojo). Círculo negro: glándula normal

Hallazgos microscopia electrónica

Cortes semifinos

Sistema Nervioso Central

En cerebelo, se observaron con mayor detalle las vacuolas citoplasmáticas en las células de Purkinje de los ovinos del grupo tratado. En estas células se distinguieron numerosas vacuolas que ocupaban más de la mitad del espacio citoplasmático. En las muestras de los ovinos del grupo control, las células de Purkinje y las células estrelladas se observaron con el citoplasma homogéneo y sin vacuolización (Figura 9).

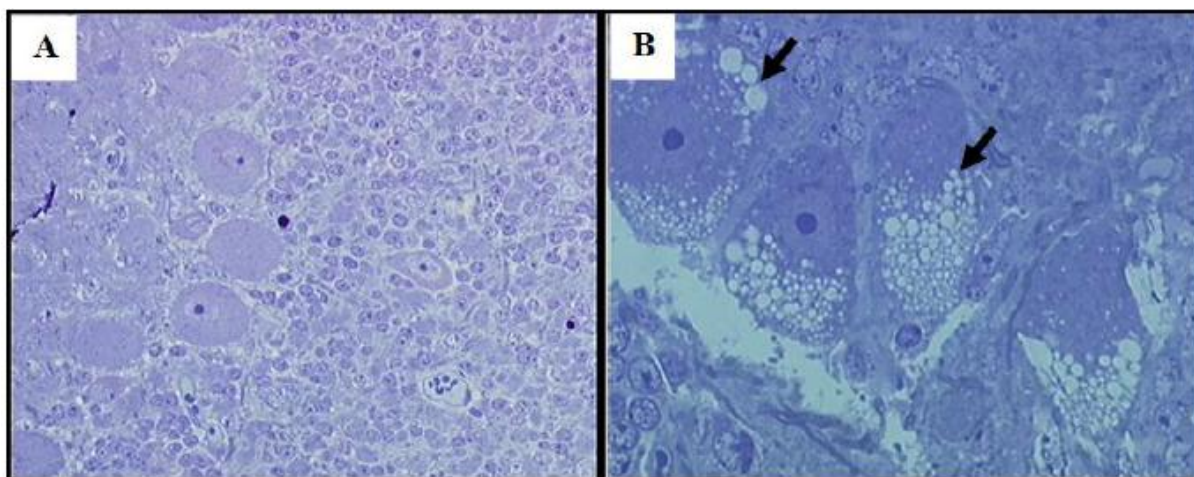


Figura 9. Células de Purkinje y estrelladas con citoplasma homogéneo y normal de un ovino del GC (A). Células de Purkinje con numerosas vacuolas citoplasmáticas (flechas) de un ovino del GT (B)

Útero

En ovinos del grupo tratado se observó un patrón de vacuolización principalmente en epitelio uterino. Sobre el borde apical del epitelio se apreció la ausencia de secreción; sin embargo, los gránulos de secreción se mantuvieron en cantidad y tamaño. En animales de control se observaron células cilíndricas con un componente con aspecto mucoso sobre el borde apical del epitelio (Figura 10).

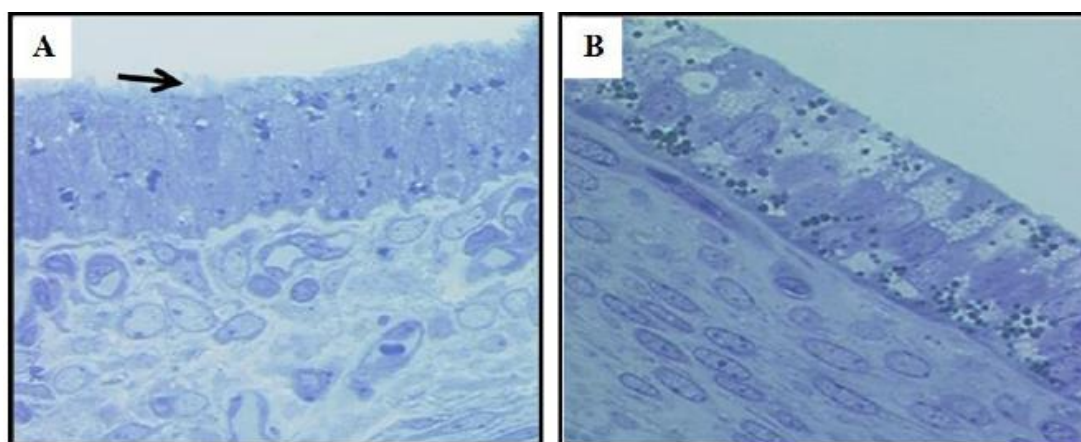


Figura 10. Epitelio uterino de células cilíndricas con citoplasma homogéneo y secreción mucosa (flecha) en un ovino del GC (A). Epitelio uterino con numerosas vacuolas citoplasmáticas de un ovino del GT (B)

Cortes ultrafinos

Sistema Nervioso Central

Ultraestructuralmente, en las células de Purkinje las vacuolas midieron entre 1-10 μm constituidas por una membrana simple. La mayoría de las vacuolas contenían material granuloso electrodensó en su interior correspondiente a fragmentos de membrana, sustancias amorfas o gránulos densos. Este patrón se observó en las células de Purkinje, células de la granulosa y astrocitos (Figura 11).

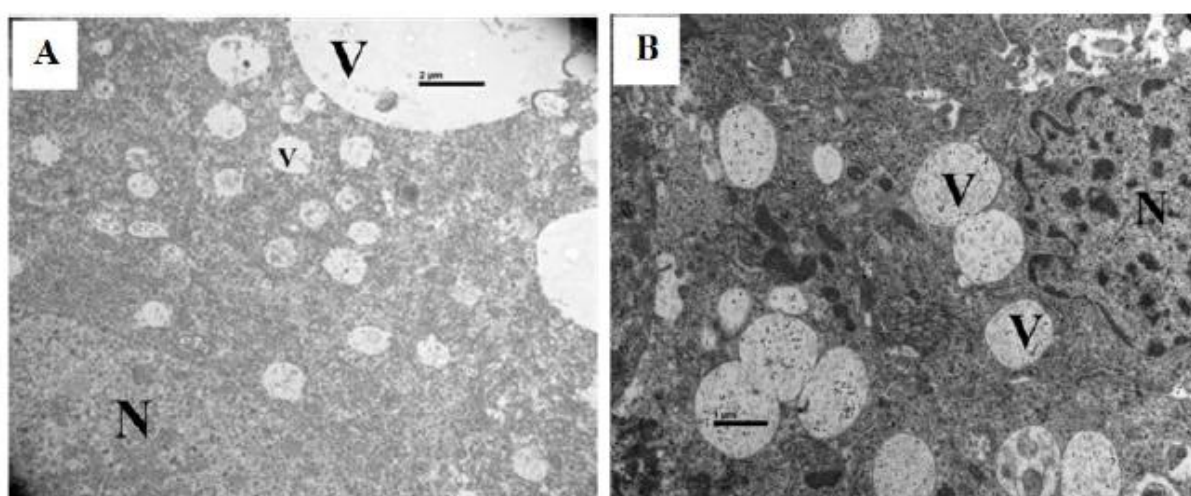


Figura 11. Célula de Purkinje de un ovino del GT (A) y astrocito de un ovino del GT (B). Obsérvese la gran cantidad de vacuolas (V) citoplasmáticas de diversos tamaños y algunas con material granular en su interior. Tanto el núcleo (N) como las mitocondrias se observaron con su estructura normal. MET

Resultados de lectinohistoquímica

En cerebelo de los ovinos del grupo tratado, se observó leve marcación con las lectinas LCA y sWGA en células de Purkinje y fuerte marcación en las neuronas de los núcleos profundos (Figura 12). Con la lectina RCA la marcación fue negativa y la lectina Con-A reveló un aumento de la marcación del fondo, sin apreciarse diferencias entre los ovinos del grupo control y grupo tratado para ambas lectinas.

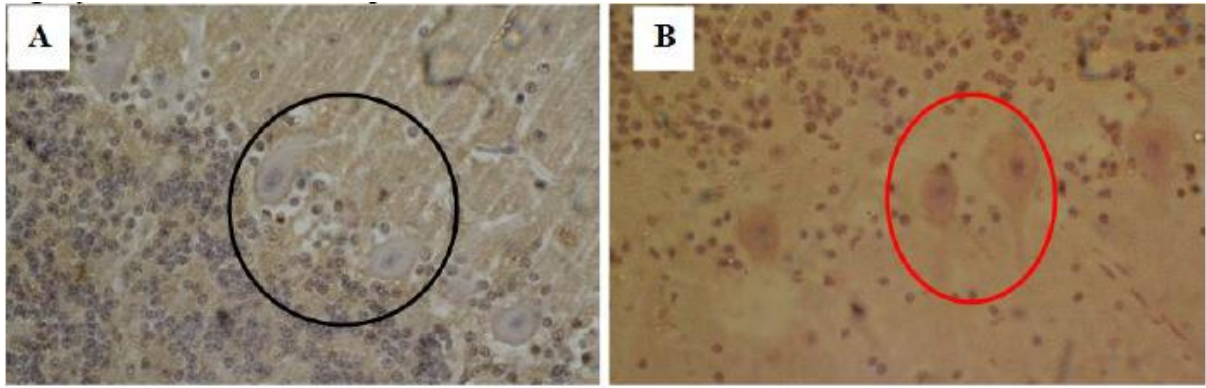


Figura 12. Células de Purkinje de un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B). La moderada marcación de color marrón pardo representa la unión para la lectina LCA (círculo rojo). En neuronas de un animal control no se observó marcación (círculo negro). LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris

En las muestras de médula oblonga de los ovinos del grupo tratado, las neuronas extrapiramidales del núcleo reticular medular fueron fuertemente marcadas en su citoplasma con las lectinas afines a α -manosa y N-acetilglucosamina (LCA y sWGA) (Figura 13). Las neuronas del núcleo hipogloso presentaron una marcación moderada con las mismas lectinas.

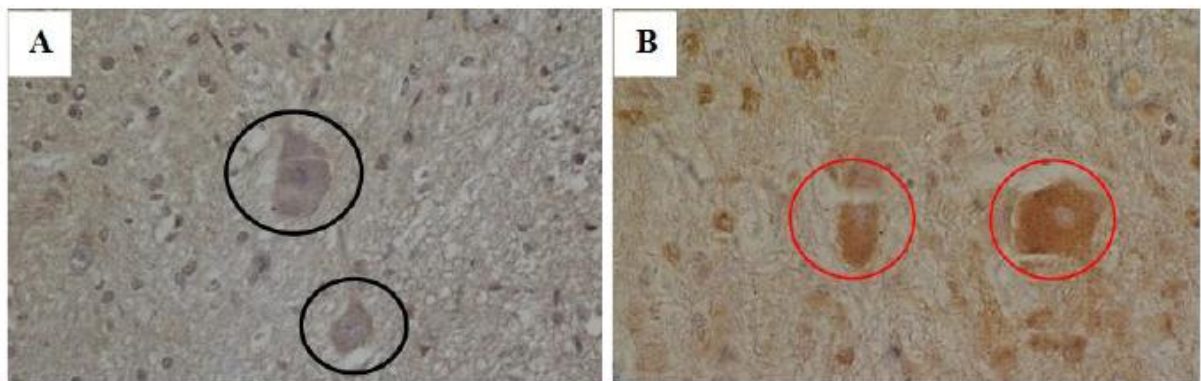


Figura 13. Médula oblonga de un ovino del GC (A) y un ovino del GT (B). La fuerte marcación de color marrón pardo representa la unión para la lectina LCA en neuronas (círculo rojo). En neuronas de un animal control no se observó marcación. LHQ. Método estreptavidina-biotina, contraste con hematoxilina de Harris

El grado de marcación con las lectinas utilizadas en diferentes grupos se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Promedio del grado de marcación de las lectinas. Se observan las diferencias en la marcación según área del SNC evaluadas para los dos grupos de ovinos. Escala subjetiva: de - a +++ (Sin marcación a Fuerte marcación)

LECTINA	NEURONAS EVALUADAS	GC	GT
LCA	Células de Purkinje	-	+
	Núcleo profundo del cerebelo	-	+++
	Núcleo Hipogloso	-	++
	Núcleo Reticular Lateral	-	+++
	Células de Purkinje	-	-
sWGA	Núcleo profundo del cerebelo	-	+++
	Núcleo Hipogloso	-	++
	Núcleo Reticular Lateral	-	++
	Células de Purkinje	+	-
RCA	Núcleo profundo del cerebelo	-	-
	Núcleo Hipogloso	-	-
	Núcleo Reticular Lateral	-	-
	Células de Purkinje	++	++
Con-A	Núcleo profundo del cerebelo	+	++
	Núcleo Hipogloso	++	++
	Núcleo Reticular Lateral	++	+++

Ref. (-) negativo; (+) suave; (++) moderado; (+++) fuerte

Discusión

En el presente trabajo se logró reproducir experimentalmente la intoxicación por *Astragalus pehuenches* en ovinos con una dosis diaria de 2mgSW/kg/PV durante un período de 54 días.

Numerosos trabajos realizados con otras especies de *locoweeds* han demostrado que la intoxicación genera emaciación (James y col., 1970; Stegelmeier, 1999) y pérdida del estado y deterioro general en la apariencia del animal (Huxtable y col., 1982). Sin

embargo, en este estudio no se registraron los signos clínicos anteriormente citados, lo que coincide con lo reportado por Robles y col. (2000), quienes observaron abundante reservas grasas en ovinos afectados en casos de intoxicación natural por *Astragalus pehuenches*.

Microscópicamente, la vacuolización en sistema nervioso central, útero y riñón fue la lesión más significativa encontrada en los ovinos intoxicados. A nivel del sistema nervioso central esta lesión varió en tipo e intensidad según el tipo de neuronas evaluadas. Las células de Purkinje fueron la principal población neuronal afectada tanto por intensidad de la lesión y tipo de vacuolización. Tanto los resultados histopatológicos a nivel de sistema nervioso central como renal coinciden con las lesiones observadas en el caso natural ocurrido en el año 2000 (Robles y col., 2000), en ovinos intoxicados experimentalmente con *Astragalus lentiginosus* y *Oxytropis sericea* (Van-Kampen y col., 1971; Stegelmeier y col., 1999) y en otras α -manosidosis adquiridas (de Balogh y col., 1999; Driemeier y col., 2000).

La caracterización realizada en forma detallada de las lesiones en diferentes núcleos encefálicos del SNC podrían ser utilizados para la determinación de qué muestras son las más apropiadas para ser tomadas para el estudio a nivel histopatológico. Por ejemplo, una muestra de cerebelo, otra de corteza frontal y de médula oblonga a la altura del óbex fijadas en formol, serían suficientes para confirmar un diagnóstico presuntivo de intoxicación por *Astragalus* u otro género de plantas que contiene swainsonina.

A nivel regional, la severa vacuolización en las células de Purkinje podría ser considerada de significancia diagnóstica. En la Patagonia argentina, la ausencia de enfermedades exóticas productoras de vacuolización en neuronas como scrapie y encefalopatía espongiiforme bovina (EEB) (Schudel y col., 1997), y la ausencia de otros géneros de plantas que produzcan enfermedad de almacenamiento lisosomal como *Ipomoea spp*, *Sida spp*, *Oxytropis spp*, nos permiten proponer a esta lesión como lesión

patognomónica en la región, para la intoxicación por plantas del género *Astragalus spp.*

Las lesiones encontradas en el útero son consideradas un hallazgo novedoso. Si bien el aspecto reproductivo de la intoxicación ha sido estudiado a nivel placentario (Armien y col., 2011), por sus efectos estrogénicos (James & Foote, 1972), abortigénicos (van Kampen y col., 1971), y teratogénicos (James, 1975), el útero no había sido producto de estudio con anterioridad al presente trabajo. Las lesiones caracterizadas por vacuolización fueron observadas en epitelio uterino y células epiteliales de la glándula endometrial. El útero tiene implicancia a lo largo de todo el período gestacional tanto en la implantación embrionaria, en el desarrollo placentario y luego en la expulsión del feto. En los ovinos del grupo tratado fueron observados, mediante microscopia óptica y electrónica, modificaciones morfofuncionales en células epiteliales uterinas. Estas modificaciones podrían alterar el normal desarrollo y desenlace de la gestación, que podrían explicar las pérdidas gestacionales que son imputadas en la intoxicación por plantas con swainsonina (James & Foote, 1972).

El patrón de marcación de las lectinas coincide con reportes anteriores, confirmando que existe material glicosilado acumulado en el citoplasma celular y que este material está principalmente constituido por compuestos ricos en manosa y N-acetilglucosamina, según la unión específica de lectinas como LCA y sWGA, respectivamente. De esta forma se corrobora la utilidad de utilizar la lectinohistoquímica para la confirmación de α -manosidosis adquirida (Alroy y col., 1985; Driemeier y col., 2000).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que *Astragalus pehuenches* produce una enfermedad de almacenamiento lisosomal similar a la que se produce por el consumo de otras especies de plantas que contienen swainsonina. El éxito en la reproducción experimental de la intoxicación permitirá profundizar los estudios de la enfermedad con el fin de determinar métodos de diagnóstico precoz, tratamiento y/o prevención de la intoxicación en ovinos.

Referencias

- Alroy, J.; Orgad, U.; Ucci, A.A.; Gavris, V.E. (1985). Swainsonine toxicosis mimics lectin histochemistry of mannosidosis. *Veterinary Pathology*. 22: 311-316.
- Armién A.G.; Tokarnia C.H.; Vargas Peixoto P.; Barbosa J.D.; Frese K. (2011). Clinical and morphologic changes in ewes and fetuses poisoned by *Ipomoea carnea* subspecies *fistulosa*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 23:221-232.
- Califano, ML, Echazú, F. (2013). Etnobotánica en comunidades pastoriles. Conocimiento tradicional sobre especies tóxicas para el ganado en la cuenca del río Iruya (Salta, Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina Botánica*. 48: 2.
- Chenchen, W; Wenlong, W; Xiaoxue L; Feng, M; Dandan, C; Xiaowen, Y; Shanshan; W; Pengshuai, G; Hao, L; Baoyu, Z. (2014). Pathogenesis and preventive treatment for animal disease due to locoweed poisoning. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 37: 336-347.
- Cook D., Gardner D.R., Grum D., Pfister J.A., Ralphs M.H., Welch K.D., Green B.T. (2011). Swainsonine and endophyte relationships in *Astragalus mollissimus* and *Astragalus lentiginosus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59:1281- 1287.
- Cook D., Ralphs M. H., Welch K. D., Stegelmeier B.L. (2009). Locoweed Poisoning in Livestock. *Rangelands* 31: 16-21.
- CPVCS. Catálogo de las Plantas Vasculares del Cono Sur. (2014). Sitio web: <<http://www.darwin.edu.ar/Proyectos/FloraArgentina/fa.htm>>
- de Balogh, K.K.I.M.; Dimande, A.P.; van der Lugt, J.J.; Molyneux, R.J.; Naude', T.W.; Welman, W.G. (1999). A lysosomal storage disease induced by *Ipomoea carnea* in goats in Mozambique. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 11:266-273.
- Driemeier D., Colodel E. M., Gimeno E. J., Barros S. S. (2000). Lysosomal storage disease caused by *Sida carpinifolia* poisoning in goats. *Veterinary Pathology*. 37: 153-159.
- Gómez-Sosa, E. (1979). Las especies sudamericanas del género *Astragalus* (Leguminosae). Las especies patagónicas argentinas. *Darwiniana*, 22: 313-376.
- Huxtable C.R. and Dorling, P.R. (1982). Swainsonine-Induced Mannosidosis. *American Association of Pathologists*. 117: 124-126.
- James L., van Kampen E., Hartley W.L. (1970). Comparative pathology of *Astragalus* (Locoweed) and *Swainsona* poisoning in sheep. *Veterinary Pathology*. 7: 116-125.
- James, L. & Foote, W. (1972). Estrogenic Properties of Locoweed (*Astragalus lentiginosus*). *Can. J. Comp. Med.* 36: 360-365.

- James, L. (1975). Effect of Locoweed (*Astragalus lentiginosus*) Feeding on Fetal Lamb Development. Can. J. Comp. Med. 40: 380-384.
- Martinez, A.; Robles, CA; Gimeno, EJ. (2014). Intoxicación por garbancillo o yerba loca. Revista Presencia 62:5-8.
- Micheloud, JF; Salguero, K; Marin, R; Martinez, O; Gimeno, EJ. (2014). Primera confirmación de la intoxicación por *Astragalus garbancillo* en ovinos en Argentina. XLII Jornadas Uruguayas de Buiatria. Pp 188. ISSN 1688-6674.
- Molyneux R.J y Gómez-Sosa E. (1991). Presencia del alcaloide indolizidínico Swainsonine en *Astragalus pehuenches* (Leguminosae galegaeae). Boletín Sociedad Argentina Botánica. 27: 59-64.
- Peters, M. (2002). A laboratory manual for the dissection of the sheep brain. Ed. The University of Guelph. Canada.
- Ragonese, AE. (1975). Plantas tóxicas para el ganado de la República Argentina. Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria. Tomo XXIX. N°3.
- Robles C.A., Saber C., Jeffrey M. (2000). Intoxicación por *Astragalus pehuenches* (locoismo) en ovinos Merino de la Patagonia Argentina. Revista de Medicina Veterinaria. 81: 380-384.
- Schudel, A.A.; Alvarez, C; Clos, P; Kistermann, JC; Blanco Viera, J; Carillo, BJ; Weber, EL. (1997). Scrapie, risk factors in Argentina. Informe técnico de la Secretaria de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Nación Argentina. ISBN: 987-96849-1-5.
- Stegelmeier B.L., James L. F., Panter K. E., Gardner D. R, Pfister J. A., Ralphs M. H., Molyneux R. J. (1999). Dose response of sheep poisoned with locoweed (*Oxytropis sericea*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation. 11: 448-456.
- Stegelmeier, B.L., Green B.T., Panter K.E., Welch K.D., Hall J.O. (2009). Identifying Plant Poisoning in Livestock. *Rangelands*. 31:5-9.
- Tokarnia, C.H. (2012). Plantas tóxicas do Brasil para animais de produção. Ed. Helianthus. ISBN 978-85-87809-03-2.
- Van-Kampen K.R. & James L.F. (1971). Ovarian and Placental Lesions in Sheep from Ingesting Locoweed (*Astragalus lentiginosus*). Vet. Path. 8: 193-199.